

心理社会的ストレスへの感受性と レジリエンスを決定する脳内分子メカニズム

稲葉 啓通✉

うつ病は深刻な健康問題であり、心理社会的ストレスがその発症に寄与するといわれている。しかし、慢性的なストレス環境下でもうつ病になる人とならない人がいるように、ストレス適応には個人差が存在するが、そのメカニズムは不明である。うつ病の病態メカニズム解析については、これまで慢性的な心理社会的ストレスを負荷した動物モデルが用いられてきた。動物もヒトと同様、同じようなストレス環境下でも行動異常を示す個体（感受性）と示さない個体（レジリエンス）がいる。しかし、このようなストレス適応の個体差に注目した基礎的研究はまだ少ない。われわれはストレス適応の異なる2種類のマウス系統を用いて、心理社会的ストレス適応に必須の脳部位を探索し、前帯状皮質（ACC）を同定した。また、うつ病患者を対象としたACCにおける遺伝子発現データと動物モデルのデータとを照合するトランスレーショナルな視点を取り入れることで、ヒトとマウスに共通のストレス適応にかかわる分子として転写因子 Fos を同定した。さらに、*fos* 遺伝子の発現制御にかかわる新たな分子経路の同定に成功し、人為的にストレス感受性とレジリエンスを制御する技術を開発した。以上の成果は Science Advances 誌に報告し、このたび、日本精神神経学会の精神医学奨励賞をいただいた。

索引用語 うつ病，ストレス，レジリエンス，前帯状皮質，分子メカニズム

はじめに

うつ病は遺伝的要因と環境的要因の複雑な相互作用により発症すると考えられており、特に慢性的なストレスへの適応の成否が発症において重要となる^{3,7,10,12,16,18,19}。ヒトでもマウスでもストレスへの反応性には個体差があるが、その分子メカニズムは不明である。われわれは、動物実験

において、慢性ストレスに対する行動反応の系統差を利用することで遺伝・環境相互作用がどのようにレジリエンスと感受性の構築にかかわるのかを明らかにすることができると考えた。本研究⁹⁾では反応性の異なる2系統のマウス、すなわちストレスレジリエンスを示す C57BL/6 J (B6) マウスとストレス感受性を示す BALB/c (BALB) マウス^{5,17,20)}を用いて、心理社会的ストレスへの適応メカニズムの解明を試みた。本稿では、心理社会的ストレスによる

著者所属：京都大学医学部附属病院精神科神経科

✉ E mail：h_inaba@kuhp.kyoto-u.ac.jp

受付日：2024 年 10 月 26 日

受理日：2025 年 1 月 8 日

doi：10.57369/pnj.25-055

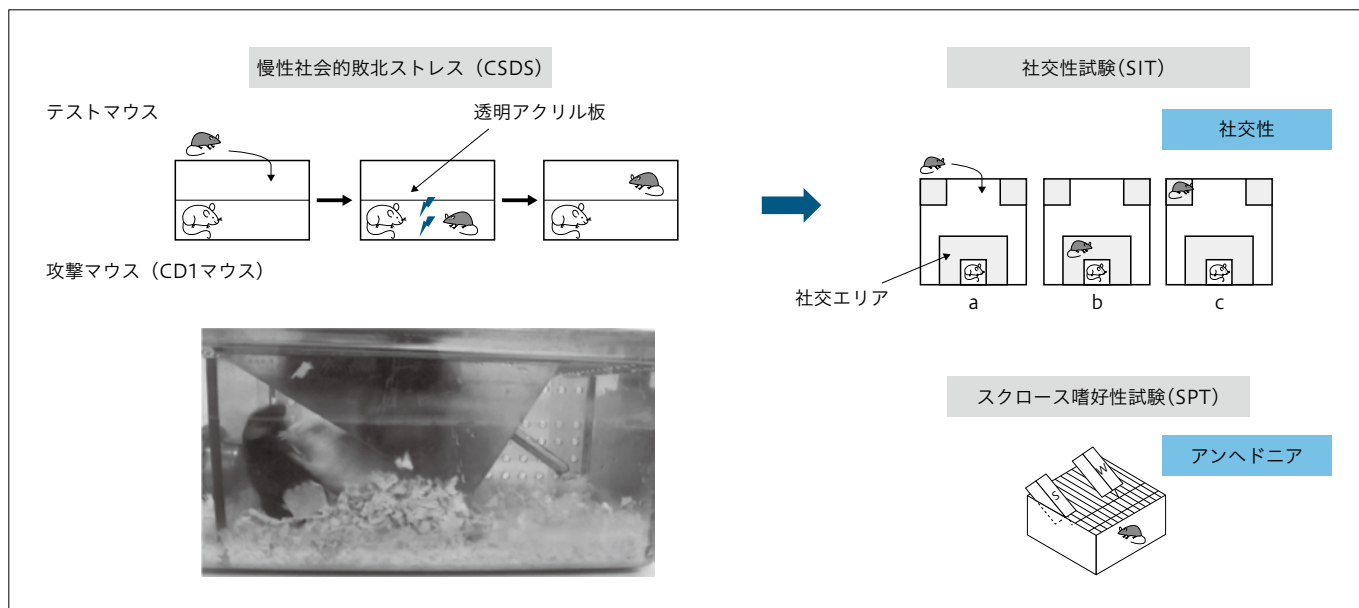


図1 慢性社会的敗北ストレス (CSDS) と社交性試験 (SIT), スクロース嗜好性試験 (SPT)

亜慢性社会的敗北ストレス (smSDS) では 5 分間の肉体的ストレス, 24 時間の心理的負荷を 5 日間与える。SIT は社交性を, SPT では水とスクロース水のうちどちらをより好むかを評価する。

行動変容の個体差構築にかかわる脳内分子メカニズムの解析結果について概説したい。本研究は, 慢性的なストレスへの適応に影響を与える細胞内シグナル伝達経路について解明したものであり, うつ病の病態メカニズムの理解と臨床応用への可能性が期待される。

なお, すべての動物に関する研究および実験手順は, 京都大学の動物実験倫理委員会の承認を得て実施した。

1. ストレスモデルの確立

現在, 最もポピュラーなストレス課題として, 慢性社会的敗北ストレス (chronic social defeat stress: CSDS)^{2,11)} が挙げられる。CSDS は図 1 のように, 攻撃性の高い雄の CD1 マウスのいるケージの中に, テストマウスを 10 分間入れる。CD1 マウスはテストマウスに噛みつくなどの攻撃を行い, テストマウスにとっては肉体的ストレスとなる。10 分間のストレス終了後, 細かい穴の開いた透明なプラスチック板を介して 2 匹を 1 日同居させ, 視覚と嗅覚などによる心理的ストレスを負荷する。この操作を 10 日間繰り返し, その後に社交性試験 (social interaction test: SIT) とスクロース嗜好性試験 (sucrose preference test: SPT) を用いてマウスの行動を評価する。SIT は社交性を評価するもので, ゲージに初めて接触する CD1 マウスを入れておき, その周囲の社交エリアにテストマウスが滞在した時

間を社交時間として計測する。通常, マウスは相手マウスに対して興味をもち近くに寄るが, うつモデルマウスの社交時間は減少する。SPT は, 水とスクロース水のうちどちらをより好むかを評価するもので, うつモデルマウスではスクロース水への好みが減り, ヒトでいうアンヘドニアに相当すると考えられている。これらは抗うつ薬の慢性投与によって回復することが知られているなど, この実験パラダイムはうつ病の動物モデルとして妥当性があると評価され, 広く用いられている¹⁵⁾。

一方, われわれは遺伝・環境相互作用の観点からのストレスモデルを確立するため, CSDS よりも軽微な亜慢性社会的敗北ストレス (subchronic and mild social defeat stress: smSDS) を用いた。smSDS の手順は基本的に CSDS と同様であるが, CD1 マウスとの接触時間を 10 分から 5 分に, 日数を 10 日間から 5 日間に短縮する¹⁷⁾。

B6 マウス, BALB マウスそれぞれに smSDS を 5 日間負荷し, SIT と SPT を行った。その結果, B6 マウスでは smSDS 後も社交時間とスクロース嗜好性ともに低下しなかったのに対し, BALB マウスではストレスを与えなかった non-stress (NS) 群に比べて社交時間もスクロース嗜好性も有意に低下した (図 2 a)。これらの結果から, これまでの先行研究^{4,17,20)}通り, B6 マウスはレジリエンスモデル, BALB マウスはストレス感受性モデルとしての妥当性を確認した。

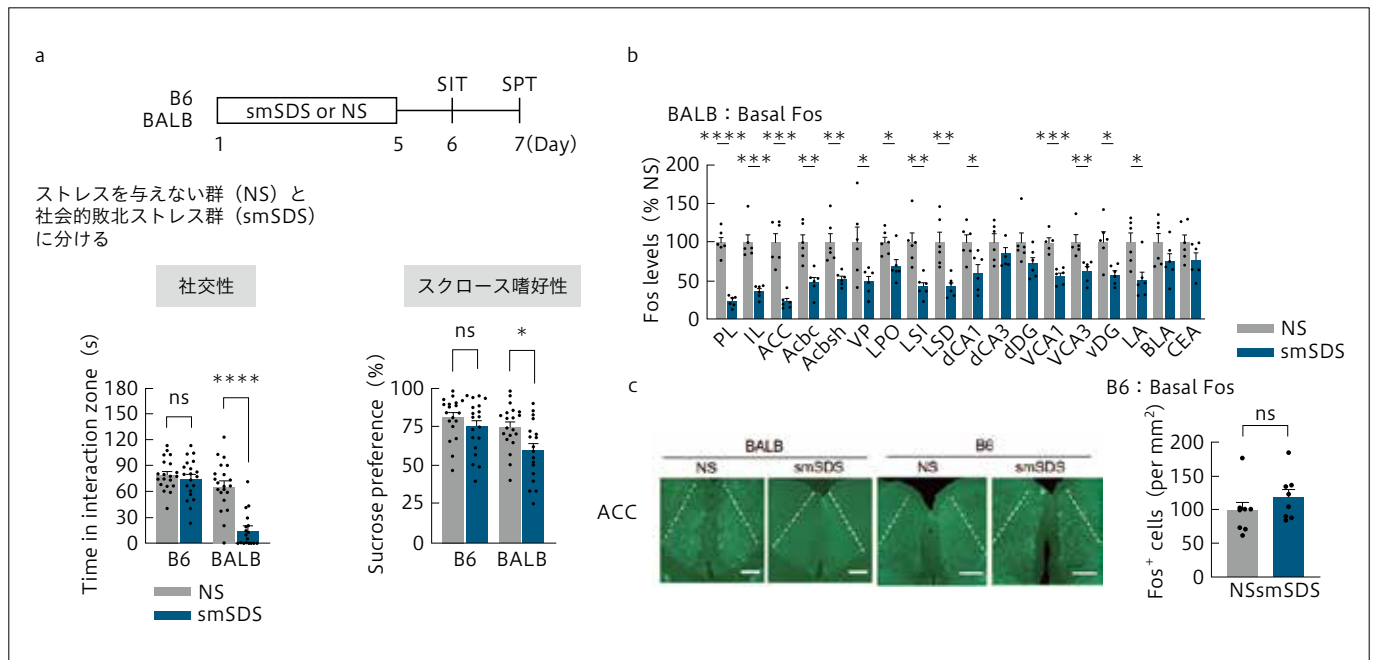


図2 マウス系統によるストレス反応性の違いと、広域脳 Fos 発現マッピング解析

PL (prelimbic cortex : 前辺縁皮質), IL (infralimbic cortex : 下辺縁皮質), ACC (anterior cingulate cortex : 前帯状皮質)

a : B6 マウスでは smSDS 後も社交時間とスクロース嗜好性ともに低下しなかったのに対し, BALB マウスでは社交時間もスクロース嗜好性もストレスを与えなかった NS (non-stress) 群に比べて有意に低下した。

b : 脳領域 18 部位において Fos 発現を定量した。

c : ACC ではストレス感受性モデルの BALB マウスでは Fos 発現が低下, レジリエンスモデルである B6 マウスでは Fos 発現の低下は認められなかった。

(文献 9 より引用)

II. ストレス適応にかかわる脳領域の探索

B6・BALB マウスに smSDS を負荷し, 脳を摘出して神経活動マーカーである Fos 発現を c-Fos 抗体を用いた免疫染色により脳領域 18 部位において定量した。その結果, ストレス感受性モデルの BALB マウスでは多くの部位において Fos 発現の有意な低下がみられ, 特に前帯状皮質 (anterior cingulate cortex : ACC) を含む前頭前野領域で顕著であった (図 2 b)。一方でレジリエンスモデルである B6 マウスの ACC では Fos 発現, の低下は認められず, ACC における Fos 発現, つまり神経活動の差がストレス感受性・レジリエンスに関与している可能性が示唆された (図 2 c)。

III. ストレス適応にかかわる分子の同定

ストレス適応に対する ACC の役割を詳細に調べるため, ストレス感受性の BALB マウス ACC における発現変動遺伝子群を RNA-seq により網羅的に検証した。その結果,

290 の発現変動遺伝子群が得られた。さらに既報のうつ病患者死後脳の ACC における RNA-seq データ¹⁾と照合し, ヒトとマウスに共通して発現が低下していた遺伝子を 7 つ抽出した。定量的リアルタイム PCR による validation 実験を行い, 最終的に ACC 内におけるヒトとマウスに共通するうつ関連候補分子として Fos を抽出した。

そこで, ACC における Fos の機能を調べるため, ゲノム編集技術を用いて ACC グルタミン酸作動性神経細胞に選択的に Fos の遺伝子ノックダウンを行った (図 3)。Camk2a プロモーター制御下で Staphylococcus aureus Cas9 (SaCas9) と c-fos (sgFos) を標的とするシングルガイド RNA (sgRNA) を共発現するアデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus : AAV) をストレスレジリエンスを示す B6 マウスの ACC に注入した。smSDS を負荷したところ, 本来ならストレスレジリエンスを示す B6 マウスの社交性が有意に低下し, 感受性が亢進した。一方, スクロース嗜好性には影響がなかった。この結果から, Fos がストレス負荷後の社交性制御に重要な役割を有していることが示唆された。

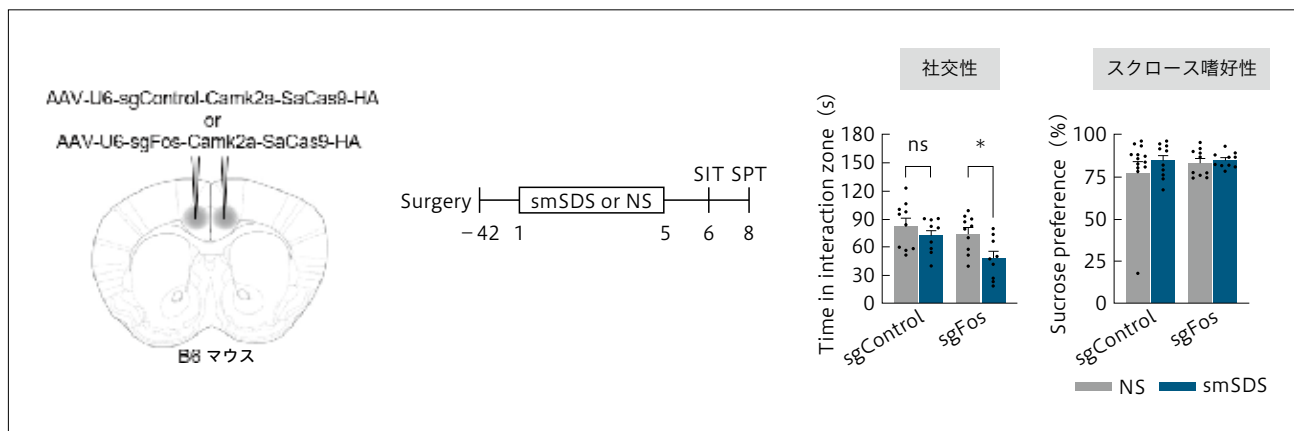


図3 ACC グルタミン酸作動性神経細胞における Fos ノックダウン実験と結果

B6 マウスの ACC に AAV を注入して Fos をノックダウンし、smSDS を与えたところ社交時間が有意に低下した。
(文献 9 より引用)

IV. ACC 神経細胞の活性制御による ストレス適応の操作

ストレス感受性モデルである BALB マウスでは ACC における Fos 発現の有意な低下（興奮性の低下）を認めたことから、ACC 神経細胞の活動性を高めることでレジリエンスを促せるのではないかと考えた。そこで薬理遺伝学ツールである designer receptors exclusively activated by designer drugs (DREADDs) を用いて ACC グルタミン酸作動性神経細胞を活性化させた。具体的には BALB マウスの ACC に Camk2a プロモーター制御下で hM3Dq を発現する AAV ベクターを投与し、その後、5 日間 clozapine N-oxide (CNO) を投与することによって Gq-PCR 経路で ACC グルタミン酸作動性神経細胞を活性化させ、行動評価を行った。その結果、予想に反して社交性が有意に低下した（スクロース嗜好性には影響なし）。次に神経細胞の活動を抑制した場合についても検証した。遺伝的背景が B6 である vGlut-Cre マウスの ACC に、Cre 依存的に hM4Di を発現する AAV ベクターを投与し、その後 smSDS を与える 30 分前に CNO を投与することによって ACC グルタミン酸作動性神経細胞のストレスによる活性化を抑制した。この操作を 5 日間反復させたところ先ほどと同様、社交性の低下を認めた（スクロース嗜好性には影響なし）。つまり、ACC の神経細胞を活性化させても抑制しても社交性が低下するといった奇妙な結果を得た。

hM3Dq は Gq-PCR シグナルを活性化することで小脳体からの Ca^{2+} 放出を促進する一方、hM4Di は Gi-PCR

シグナルを刺激することで cAMP シグナルを抑制する。つまり、人為的に神経細胞の活性化・抑制を行っていたものの、細胞内シグナルの視点で見ると異なるシグナル経路の操作を行っていたことに気が付きを得た。

そこで、cAMP シグナルの活性化と Gq-PCR による Ca^{2+} シグナルの抑制を試みた。DREADDs を用いて ACC 神経細胞の cAMP シグナルを活性化させた場合にはストレス感受性モデルである BALB マウスにおいて社交性の低下が認められず、レジリエンスマウスの表現型を示した。Gq-PCR による Ca^{2+} シグナルの抑制については、Gq-PCR シグナルを減少させるツールとして開発された $i\beta$ ARK ペプチド¹³⁾を入手し、Gq-PCR シグナルを阻害したマウスを作製してストレス適応を評価した。その結果、 $i\beta$ ARK 発現マウスは smSDS 負荷後に社交性の低下を認めず、レジリエンスマウスの表現型を示した（スクロース嗜好性には影響なし）。

以上の 4 種類の実験と結果を表にまとめる（図 4）。Gq-PCR を介する Ca^{2+} シグナルが活性化するとストレス感受性に、抑制するとストレスレジリエンスにつながる可能性が、そして cAMP シグナルが活性化するとストレスレジリエンスに、抑制するとストレス感受性につながる可能性が示唆された。2 つのシグナルは、ストレスによる社交性障害に関して逆の作用をもつ可能性が示唆された。

V. 考 察

本研究では Gq-PCR を介する Ca^{2+} シグナルの活性化により、社交性の低下を引き起こすことが示された。一方、

神経活動活性化

Gq-GPCR シグナルの活性化 (hM3Dq) → **Ca²⁺シグナル**の活性化→ストレス感受性 (社交性の低下)
Gs-GPCR シグナルの活性化 (rM3Ds) → **cAMP シグナル**の活性化→レジリエンス (社交性の低下なし)

神経活動抑制

Gq-GPCR シグナルの抑制 (iβARK) → **Ca²⁺シグナル**の抑制→レジリエンス (社交性の低下なし)
Gi-GPCR シグナルの活性化 (hM4Di) → **cAMP シグナル**の抑制→ストレス感受性 (社交性の低下)

	活性化	抑制
Gq-GPCR を介した Ca ²⁺	ストレス感受性 (社交性の低下)	ストレスレジリエンス
cAMP	ストレスレジリエンス	ストレス感受性 (社交性の低下)

図 4 4 種類の実験と結果

Gq-GPCR を介する Ca²⁺シグナルと cAMP シグナルは、ストレスによる社交性障害に関して逆の作用をもつ可能性が示唆された。

先行研究では Ca²⁺シグナルの活性化はストレスレジリエンスや抗うつ作用に重要であるとの報告があり、本研究の結果と矛盾する^{17,21)}。仮説として、Ca²⁺の由来の違いの関与を考えた。すなわち、Ca²⁺透過性 AMPA 受容体の GluA1 を介したシナプスからの Ca²⁺流入による Ca²⁺シグナルはストレスレジリエンスや抗うつ作用に、一方で Gq-GPCR 経路の活性化に伴う小胞体からの Ca²⁺放出はストレス感受性にかかわるのでないかと考えた。事実、Gq-GPCR による小胞体からの Ca²⁺イオンの放出をさせない mGlu5 のペプチドは抗うつ作用を有する⁸⁾という報告や、小胞体膜上に存在する Ca²⁺チャネルであるリアノジン受容体 (ryanodine receptor : RyR) に関する報告^{6,14)}もその仮説を支持するものである。とはいえこれは仮説の域を出ず、さらなる検証が必要である。

本研究の限界として、実験手法の特性上オスマウスのみを使用しており、同じ知見がメスでも認められるか検証が必要であること、そして示された知見は ACC におけるものであり、他の部位においても Gq-GPCR を介した Ca²⁺シグナルと cAMP シグナルに同様の違いがあるかどうかは検証の余地があることが挙げられる。

おわりに

本研究により得られた知見は、ストレス関連疾患の病態生理の解明と治療法の開発につながる可能性がある。さらなる検証を積み重ね、基礎研究と臨床を結びつけられるよう微力ながら精進していきたい。

利益相反

本研究に関連し、開示すべき COI 関係にある企業として共同研究費を助成いただいた塩野義製薬株式会社が挙げられる。

謝辞

本研究の実施にあたり、ご指導・ご助力いただいた先生方に深謝いたします

京都大学 SK プロジェクト：内田周作先生、大石直也先生、村井俊哉先生、李海燕先生、九野（川竹）絢子先生、安田直人様、石森絵里菜様
理化学研究所：長井淳先生、出羽健一先生

文献

- 1) Akula, N., Marengo, S., Johnson, K., et al. : Deep transcriptome sequencing of subgenual anterior cingulate cortex reveals cross-diagnostic and diagnosis-specific RNA expression changes in major psychiatric disorders. *Neuropsychopharmacology*, 46 (7) ; 1364-1372, 2021
- 2) Berton, O., McClung, C. A., DiLeone, R. J., et al. : Essential Role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science*, 311 (5762) ; 864-868, 2006
- 3) de Kloet, E. R., Joëls, M., Holsboer, F. : Stress and the brain : from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*, 6 (6) ; 463-475, 2005
- 4) Dulawa, S. C., Holick, K. A., Gundersen, B., et al. : Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacology*, 29 (7) ; 1321-1330, 2004
- 5) Francis, D. D., Szegda, K., Campbell, G., et al. : Epigenetic sources of behavioral differences in mice. *Nat Neurosci*, 6 (5) ; 445-446, 2003
- 6) Galeotti, N., Vivoli, E., Bartolini, A., et al. : A gene-specific cerebral types 1, 2, and 3 RyR protein knockdown induces an antidepressant-like effect in mice. *J Neurochem*, 106 (6) ; 2385-2394, 2008
- 7) Herman, J. P. : Neural control of chronic stress adaptation. *Front*

- Behav Neurosci, 7 ; 61, 2013
- 8) Holz, A., Mülsch, F., Schwarz, M. K., et al. : Enhanced mGlu5 signaling in excitatory neurons promotes rapid antidepressant effects via AMPA receptor activation. *Neuron*, 104 (2) ; 338–352. e7, 2019
 - 9) Inaba, H., Li, H., Kawatake-Kuno, A., et al. : GPCR-mediated calcium and cAMP signaling determines psychosocial stress susceptibility and resiliency. *Sci Adv*, 9 (14) ; eade5397, 2023
 - 10) Kawatake-Kuno, A., Murai, T., Uchida, S. : The molecular basis of depression : implications of sex-Related differences in epigenetic regulation. *Front Mol Neurosci*, 14 ; 708004, 2021
 - 11) Krishnan, V., Han, M. H., Graham, D. L., et al. : Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell*, 131 (2) ; 391–404, 2007
 - 12) McEwen, B. S., Bowles, N. P., Gray, J. D., et al. : Mechanisms of stress in the brain. *Nat Neurosci*, 18 (10) ; 1353–1363, 2015
 - 13) Nagai, J., Bellafard, A., Qu, Z., et al. : Specific and behaviorally consequential astrocyte Gq GPCR signaling attenuation in vivo with i β ARK. *Neuron*, 109 (14) ; 2256–2274, e9, 2021
 - 14) Nakamura-Maruyama, E., Kai, R., Himi, N., et al. : Ryanodine receptors are involved in the improvement of depression-like behaviors through electroconvulsive shock in stressed mice. *Brain Stimul*, 14 (1) ; 36–47, 2021
 - 15) Nestler, E. J., Hyman, S. E. : Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci*, 13 (10) ; 1161–1169, 2010
 - 16) Russo, S. J., Nestler, E. J. : The brain reward circuitry in mood disorders. *Nat Rev Neurosci*, 14 (9) ; 609–625, 2013
 - 17) Sakai, Y., Li, H., Inaba, H., et al. : Gene–environment interactions mediate stress susceptibility and resilience through the CaMKII β /TARP γ -8/AMPA pathway. *iScience*, 24 (5) ; 102504, 2021
 - 18) Southwick, S. M., Charney, D. S. : The science of resilience : implications for the prevention and treatment of depression. *Science*, 338 (6103) ; 79–82, 2012
 - 19) Sullivan, P. F., Neale, M. C., Kendler, K. S. : Genetic epidemiology of major depression : review and meta-analysis. *Am J Psychiatry*, 157 (10) ; 1552–1562, 2000
 - 20) Uchida, S., Hara, K., Kobayashi, A., et al. : Epigenetic status of Gdnf in the ventral striatum determines susceptibility and adaptation to daily stressful events. *Neuron*, 69 (2) ; 359–372, 2011
 - 21) Zanos, P., Moaddel, R., Morris, P. J., et al. : NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites. *Nature*, 533 (7604) ; 481–486, 2016

Molecular Mechanisms in the Brain Determining Susceptibility and Resilience to Psychosocial Stress

Hiromichi INABA

Department of Psychiatry and Neurology, Kyoto University Hospital

Depression is a serious health issue and psychosocial stress contributes to its onset. However, under chronic stress, some individuals develop depression, whereas others do not. This indicates individual differences exist in stress adaptation, the mechanisms of which remain unclear. Traditionally, animal models of chronic psychosocial stress have been used to analyze the pathophysiological mechanisms of depression. Like humans, animals also exhibit individual differences in stress adaptation, with some showing behavioral abnormalities (susceptibility) and others not (resilience). However, basic research focusing on individual differences in stress adaptation remain limited.

Using two strains of mice with different stress-adaptation capabilities, we identified the anterior cingulate cortex (ACC) as a crucial brain region for psychosocial stress adaptation. By integrating translational perspectives that compare gene expression data in the ACC of patients with depression with data from animal models, we identified the transcription factor, Fos, as a molecule involved in stress adaptation that is common to both humans and mice. Furthermore, a novel molecular pathway involved in the regulation of Fos expression was successfully identified and techniques were developed to artificially control stress susceptibility and resilience. These findings were reported in *Science Advances* (Inaba et al., *Science Advances*, 2023), and I am honored to receive the Psychiatry Encouragement Award from the Japanese Society of Psychiatry and Neurology for this work.

Author's abstract

Keywords depression, stress, resilience, anterior cingulate cortex, molecular mechanisms